正交法优选调控秦艽次生代谢产物含量变化的条件

付欢欢[1]，何懿菡[1*]，尹洋洋[1]，胡伟[1]，杨烨[1]，岳正刚[1,2]

（1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心 秦药特色资源研究开发重点实验室（培育），陕西 咸阳 712046；2. 青海师范大学 生命科学学院，西宁 810016）

摘要：为优选可抑制秦艽次生代谢产物含量变化的条件，该文采用 3 因素 4 水平正交试验设计方法，共设计 16 组处理，研究洛伐他汀（MVA 途径抑制剂）、膦胺霉素（MEP 途径抑制剂）和取样时间对秦艽中马钱苷酸、獐牙菜苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷 4 种主要裂环环烯醚萜类化合物含量的影响。结果表明：（1）4 种裂环环烯醚萜类化合物含量变化受取样时间影响最大，其次为膦胺霉素浓度，次之为洛伐他汀浓度。（2）以最佳抑制条件处理后，马钱苷酸、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷含量分别下降了 69%、36%、33%和 4%。基于正交法优选的抑制条件，对 4 种化合物均可抑制。综上所述，可确定调控秦艽次生代谢产物含量变化的最佳抑制条件为膦胺霉素 400 μmol·L^{-1}，洛伐他汀 50 μmol·L^{-1}，取样时间 6 天。该条件为进一步研究 MEP 和 MVA 途径在裂环环烯醚萜类化合物代谢合成中的调控机制奠定基

础。

关键词：正交试验，MVA 途径，MEP 途径，洛伐他汀，膦胺霉素，裂环环烯醚萜

中图分类号：Q945　　**文献标识码：A**　**文章编号：**

Optimization of the conditions for regulating the content of secondary metabolites in *Gentiana macrophylla* pall by orthogonal method

FU Huanhuan[1], HE Yihan[1*], YIN Yangyang[1], HU Wei[1], YANG Ye[1], YUE Zhenggang[1,2]

(1. *Medicine State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources*(*Cultivation*), *Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi& Education Ministry*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, Xianyang712046, Shaanxi, China; 2. *College of Life Sciences*, *Qinghai Normal University*, Xining 810016, China)

Abstract: *Gentiana macrophylla* is a traditional Chinese herbal medicine for treating jaundice, hepatitis, and stomachic and choleretic ailments, and its main secondary metabolites are secoiridiod glycosides represented by gentiopicroside. The biosynthetic pathway of gentiopicroside is via MEP and MVA pathways. Fosmidomycin and lovastatin are specific inhibitors of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) of the MEP pathway and hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) of the MVA pathway, and are widely used in the

基金项目：国家自然科学基金（81903753）；陕西省重点研发计划（2022SF-089）；陕西中医药大学校级课题（2017PY06）。[Supported by National Natural Science Foundation of China（81903753）; Key Science and Technology Program of Shaanxi（2022SF-089）; School Level Program of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine（2017PY06）。

第一作者：付欢欢（1999-），硕士研究生，研究方向为药用植物资源与次生代谢调控，（E-mail）1464741616@qq.com

***通信作者：**何懿菡，博士，讲师，研究方向为药用植物资源与次生代谢调控，（E-mail）annaaid@126.com

research of the biosynthesis pathway and regulation mechanism of secondary metabolites. The article aims to test and search for the optimal condition for decreasing the contents of four secoiridiod glycosides compounds (loganic acid, sweroside, swertiamarin and gentiopicroside) in *G. macrophylla* by using the orthogonal test designs. In this study, the concentration of fosmidomycin(A), concentration of lovastatin(B) and sampling days (C) were taken as three factors, and each factor was taken as four levels to design an orthogonal test, with 16 groups of treatment. HPLC was used to determine the contents of four secoiridiod glycosides, and the data were statistically analyzed. The results were as follows: (1) The contents of the four secoiridiod glycosides compounds in *G.macrophylla* were most affected by sampling time, followed by fosmidomycin and lovastatin concentration; (2) After treatment with the optimal inhibitory conditions, the contents of loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside and sweroside decreased by 69%, 36%, 33% and 4% respectively. This work provided optimal inhibition conditions are determined to be: fosmidomycin 400 μmol·L^{-1}, lovastatin 50 μmol·L^{-1}, samples are harvested on six days for further research on the regulatory mechanism of MEP and MVA pathways in the metabolism and synthesis of secoiridiod glycosides.

Key words: orthogonal test, MVA pathway, MEP pathway, lovastatin, fosmidomycin, secoiridiod glycosides

秦艽是龙胆科（Gentianaceae）龙胆属（*Gentiana*）多年生草本植物（彭美晨和艾晓辉，2021），是国家传统中药，味辛、苦，性平，归胃、肝、胆经（杨飞霞，2020）。秦艽以根入药，不仅有祛风湿，清湿热的作用，又可以止痹痛、退虚热。用于风湿痹痛，筋脉拘挛，湿热黄疸以及小儿疳积发热等（中国药典 2020 年版）。秦艽主要含有环烯醚萜类成分，如龙胆苦苷（gentiopicroside）、獐牙菜苦苷（swertiamarin）、獐牙菜苷（sweroside）、马钱苷酸（loganic acid）等（杨飞霞，2020）。环烯醚萜类化合物有广泛的生物活性，如抗肿瘤和抗炎等作用（Tundis et al.，2008），龙胆苦苷和獐芽菜苦苷有良好的抗炎镇痛和保肝的作用（吴昕怡和刘小莉，2017；李跟旺和王磊，2018；Muhamad Fadzil et al.，2021）。

萜类化合物的生源合成途径主要由位于细胞质中的甲羟戊酸途径（mevalonate pathway，MVA 途径）和质体中的 2-甲基赤藓糖醇-4-磷酸途径（methylerythritol phosphate pathway，MEP 途径）组成（Hua et al.，2014；Liao et al.，2016）。结合长春花单萜吲哚生物碱合成途径的研究（Miettinen et al.，2014）以及秦艽转录组数据的挖掘（Cao et al.，2016），推测龙胆苦苷的生源合成途径（图 1）（康恒等，2021）主要通过 MVA 和 MEP 途径分别合成异戊烯基焦磷酸（isopentenyl diphosphate，IPP），IPP 可异构化形成其同分异构体二甲基丙烯基焦磷酸（dimethylallyl diphosphate，DMAPP），并一起缩合成焦磷酸香叶酯（geranyl pyrophosphate，GPP），GPP 再经过多步酶促反应依次合成马钱苷酸、马钱苷、裂环马钱苷以及龙胆苦苷，并衍生出獐牙菜苦苷和獐牙菜苷等萜类化合物，但中间的反应步骤尚不清楚（Liao et al.，2016; Li et al., 2022）。

目前，有关 MVA 和 MEP 途径在代谢产物合成中作用机制备受关注。膦胺霉素和洛伐他汀分别为 MEP 途径 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase，DXR）和 MVA 途径 HMG-CoA 还原酶（hydroxymethylglutaryl-CoA reductase，HMGR）的专一抑制剂（魏洁书等，2013），被广泛应用于次生代谢产物的生源合成途径及调控机制的研究。为了了解穿心莲内酯的生物合成途径，Sinha 等（2018）在穿心莲的悬浮细胞中添加洛伐他汀和膦胺霉素，结果发现 MEP 和 MVA 通路受多种水平调控，DXR 和

HMGR 的对穿心莲内酯贡献率分别为 76.6%和 77.6%，且这两种通路对穿心莲内酯的产生都有重要贡献。刘丽（2012）在人参发根中添加洛伐他汀和膦胺霉素，通过检测其次生代谢产物含量从而推断人参总皂苷生物合成的主要通路，结果发现洛伐他汀和膦胺霉素均可抑制人参总皂苷生物合成，并推测 MVA 途径在人参皂苷的生物合成中占主要作用。Rather 等（2019）在青脆枝的发根组织中添加膦胺霉素和洛伐他汀，通过评估次生代谢产物含量以及生物合成通路的主要基因的变化，研究 MVA 和 MEP 途径的相互作用，研究发现膦胺霉素和洛伐他汀可显著降低青脆枝的发根组织中 DXR 和 HMGR 的转录水平，并推测 MEP 途径是喜树碱合成前体的主要供给者。Yang 等（2012）和 Yang 等（2019）在丹参毛状根中添加洛伐他汀和膦胺霉素，探讨 MVA 和 MEP 通路在丹参毛状根细胞生长和次生代谢产物积累中的作用，结果发现 MVA 途径在丹参毛状根细胞生长中发挥着重要作用，而 MEP 途径是丹参次生代谢产物含量的积累的主要途径。有关 MVA 和 MEP 途径在秦艽次生代谢产物生物合成途径中的作用机制尚缺乏相关的研究。基于此，本研究依据抑制剂膦胺霉素和洛伐他汀的抑制原理，采用 3 因素 4 水平正交试验的方法，通过设置不同浓度的膦胺霉素和洛伐他汀处理一月生秦艽幼苗，选取不同的取样时间，通过评估其次生代谢产物含量的变化，拟筛选可抑制秦艽中马钱苷酸、獐牙菜苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷含量的最优条件。皆为进一步研究秦艽 MEP 和 MVA 代谢途径调控机制，解析裂环环烯醚萜类化合物的合成机理奠定基础。

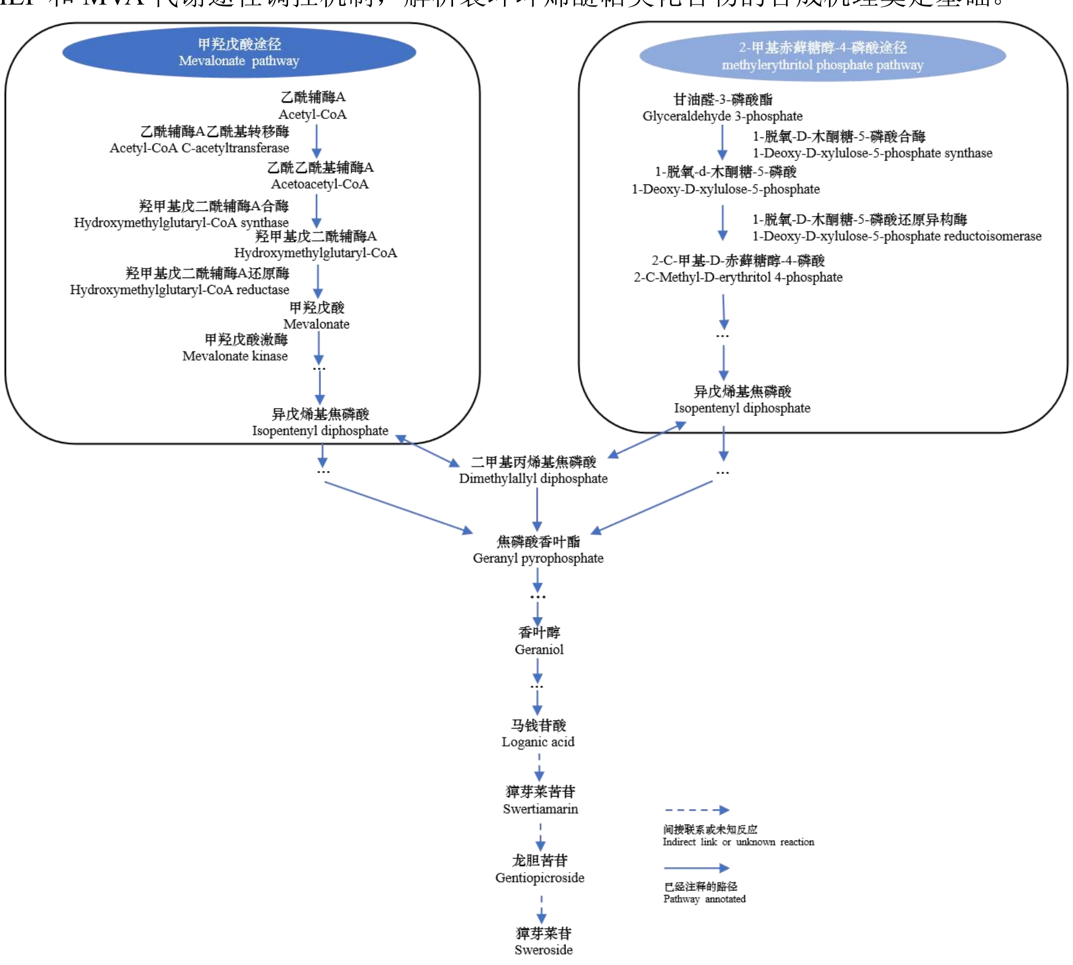


图 1 秦艽中裂环环烯醚萜类化合物合成通路简示图

Fig. 1 Schematic diagram of synthetic pathway of secoiridiod glycosides in *Gentiana*

macrophylla

1 材料与方法

1.1 材料和主要仪器

秦艽种子购自甘肃庆阳正宁县，于温室撒播种子给予 16 h 光照，8 h 黑暗处理，覆膜出苗后培养一个月（叶片 2 对生，高度 2 cm 左右）用于试验。LC-20XR 分析型高效液相色谱仪（日本岛津公司），色谱柱（Welch，4.6 mm×250 mm，5 μm），精密电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司），超声波清洗仪（小美仪器有限公司），OBS-2100 油浴锅（上海爱朗仪器有限公司）。

1.2 试剂

马钱苷酸（批号：K17S11B124207，纯度≥98%）、獐牙菜苦苷（批号：Y25J1G1429，纯度≥98%）、龙胆苦苷（批号：Y29A11Q112202，纯度≥98%）、獐牙菜苷（批号：P25O10F101344，纯度≥98%）、洛伐他汀（批号：Y23D6C7375，纯度≥98%）均购自上海源叶生物科技有限公司。膦胺霉素（批号：lX040552，CHEMEGEn 公司），甲醇（成都市科隆化学品有限公司），乙腈（上海霍尼韦尔贸易有限公司），磷酸（天津市科密欧化学试剂有限公司）。

1.3 溶液配制

精密称取 0.010 4 g 洛伐他汀于 50 mL 容量瓶中，加入 2 mL 无水乙醇，混匀后加入 20 μL 0.6 mol•L^{-1} 的 NaOH，静置 30 min，加入适量 1 mol•L^{-1} HCl 调节 pH 至 7，加纯化水定容至 50 mL，得 500 μmol•L^{-1} 的洛伐他汀母液，4 ℃备用。

精密称取 0.010 0 g 膦胺霉素于 50 mL 容量瓶中，加纯化水定容至 50 mL，超声溶解，得浓度为 546 μmol•L^{-1} 的膦胺霉素母液，4 ℃备用。

精密称取马钱苷酸 0.95 mg、獐牙菜苦苷 1.26 mg、龙胆苦苷 2.52 mg 和獐牙菜苷 1.24 mg 的对照品，加甲醇定容至 1 mL 容量瓶中，混匀，得质量浓度为马钱苷酸 0.95 mg•mL^{-1}、獐牙菜苦苷 1.26 mg•mL^{-1}、龙胆苦苷 2.52 mg•mL^{-1} 和獐牙菜苷 1.24 mg•mL^{-1} 的母液，4 ℃备用。

1.4 正交试验及样品处理

参照（于淑池，2013；罗云云，2019）按表 1 的因素、水平进行试验设计喷施处理 16 组秦艽幼苗，每组处理 30 株。处理后放置 26 ℃下光照 16 h/d^{-1}。取不同处理条件下的幼苗，用纯水冲洗干净幼苗上的土壤和杂质，滤纸吸干水分后置于旋蒸瓶中，加少量甲醇减压 1.5 h 抽干水分。将干燥后的秦艽幼苗称重后加入 1.5 mL 离心管中，加 1 mL 甲醇超声提取 3 次，每次 1.5 h，过滤得绿色的提取液，减压浓缩，得到灰绿色的固体物质，粘附在瓶壁，称重。加 1 mL 甲醇溶解，过 0.22 μm 滤膜，滤液为样品溶液。

表 1 L_{16}（4^3）正交试验安排表

Table 1 Arrangement of L_{16} (4^3) orthogonal test

处理组 Processing group	因素 Factor		
	膦胺霉素浓度（A） Fosfomycin concentration(A) (μmol•L^{-1})	洛伐他汀浓度（B） Lovastatin concentration(B) (μmol•L^{-1})	取样时间（C） Sampling time(C) (d)
T1	0	0	0
T2	0	50	2
T3	0	200	4
T4	0	400	6
T5	50	0	2
T6	50	50	0
T7	50	200	6
T8	50	400	4
T9	200	0	4
T10	200	50	6
T11	200	200	0
T12	200	400	2
T13	400	0	6
T14	400	50	4
T15	400	200	2
T16	400	400	0

1.5 HPLC 色谱条件及标准曲线绘制

流动相为 0.1%磷酸水：乙腈，洗脱梯度为 0～10 min，12%乙腈，10～13 min，10%乙腈，13～30 min，12%乙腈，流速为 0.8 mL•min^{-1}，检测波长 254 nm，进样量 10 μL，柱温为 30 ℃。

将配制好的标准品溶液分别用甲醇按照倍数稀释，制备不同浓度梯度的标准品溶液。马钱苷酸浓度梯度为 0.95、0.475、0.237 5、0.118 75、0.059 375、0.029 687 5、0.014 844 375、0.007 421 875、0.003 710 938、0.001 855 469 mg•mL^{-1}；獐牙菜苦苷浓度梯度为 1.26、0.63、0.315、0.157 5、0.078 75、0.039 375、0.019 687 5 mg•mL^{-1}；龙胆苦苷浓度梯度为 2.52、1.26、0.63、0.315、0.157 5、0.078 75、0.039 375、0.019 687 5 mg•mL^{-1}；獐牙菜苷浓度梯度为 1.24、0.62、0.31、0.155、0.077 5、0.193 75、0.009 687 5、0.004 843 75、0.002 421 875 mg•mL^{-1}的对照品溶液，依据上述色谱条件依次进样测定。以进样浓度（*X*，g•mL^{-1}）和峰面积（*Y*）绘制标准曲线。马钱苷酸的线性回归方程为 *Y*=457 124 1.60*X*-112 05.29，线性范围为 0.002 g•mL^{-1}-0.475 g•mL^{-1}；獐芽菜苦苷的线性回归方程为 *Y*=649 922 3.38*X*-245 89.43，线性范围为 0.003 g•mL^{-1}-0.630 g•mL^{-1}；龙胆苦苷线性回归方程为 *Y*=143 443 50.83*X*-442 328.21，线性范围为 0.005 g•mL^{-1} -2.520 g•mL^{-1}；獐芽菜苷线性回归方程为 *Y*=604 766 6.40*X*-406 00.10，线性范围为 0.002 g•mL^{-1}-1.240 g•mL^{-1}。

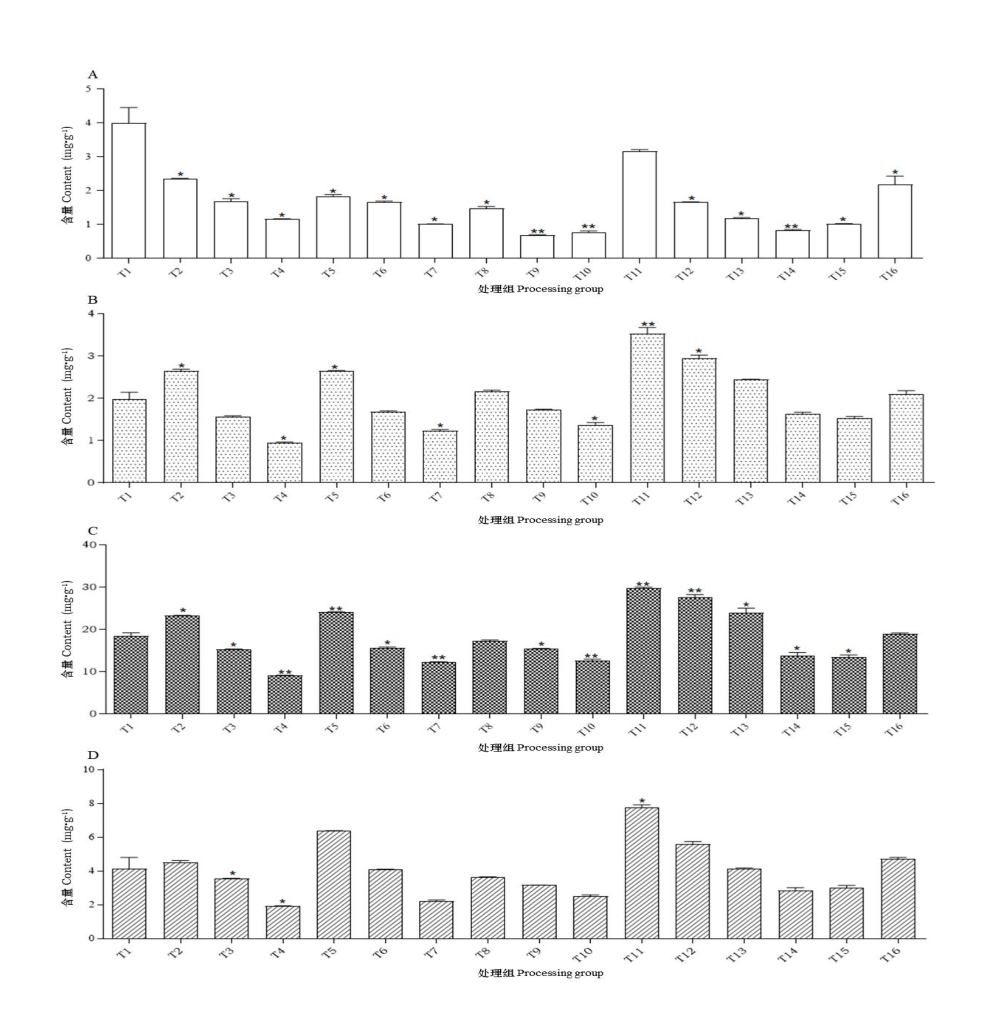
1.6 数据统计

使用 Excel 2019 对数据进行处理，使用 Minitab 18（Minitab 公司）对正交试验结果做极差分析，SPSS Statistics 26（IBM 公司）对数据进行方差分析和相关性分析，运用 GraphPad Prism 5（GraphPad 公司）软件作图。验证结果数据采用$\bar{x} \pm s$表示。抑制剂对代谢产物的抑制率计算公式：抑制率=（处理组-空白组）/空白组×100%。

2 结果与分析

2.1 次生代谢产物含量测定结果分析

经正交试验安排处理秦艽幼苗测定代谢产物含量分析发现，除 T1（空白组）外，T2 至 T16 处理组马钱苷酸（图 2：A）、獐牙菜苦苷（图 2：B）、龙胆苦苷（图 2：C）和獐牙菜苷（图 2：D）的含量变化趋势类似。与 T1 相比，不同处理条件下马钱苷酸的含量均呈降低的趋势，其中，T9、T10 和 T14 处理组的马钱酸苷含量降低最为显著，分别降低了 83%、81%和 79%，与 T1 组相比有极显著差异。比较发现，无论是单一抑制剂还是两个抑制剂共同作用，均可抑制马钱苷酸的合成，且在抑制剂浓度相同的条件下膦胺霉素对马钱苷酸的抑制率高于洛伐他汀的作用。与马钱苷酸不同的是，和 T1 组相比，大部分处理条件下獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷含量均有所降低，其中 T4 组降低最为显著，3 种代谢产物分别降低了 52%，50%和 54%；而 T2、T5 和 T12 处理组的獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷的含量不降反升。推测引起此结果的原因可能是代谢产物对抑制剂的响应强度存在差异。



A. 不同处理组马钱苷酸含量； **B.** 不同处理组獐芽菜苦苷含量； **C.** 不同处理组龙胆苦苷含量； **D.** 不同处理组獐芽菜苷含量。*表示与 T1 处理组在 $P<0.05$ 水平上显著差异；**表示与 T1 处理组在 $P<0.01$ 水平上显著差异。

A. Contents of loganic acid in different treatment groups; **B.** Contents of swertiamarin in different treatment groups; **C.** Contents of gentiopicroside in different treatment groups; **D**. Contents sweroside of in different treatment groups. *Indicates compared with T1 treatment group significant differences at 0.05 level; **Indicates compared with T1 treatment group significant differences at 0.01 level.

图 2 16 组正交实验处理条件下秦艽中 4 种环烯醚萜苷类含量的测定及分析

Fig. 2 Determination and analysis of four iridoid glycosides in *Gentiana macrophylla* under 16 groups of orthogonal experimental treatment

2.2 基于正交试验结果进行多因素方差分析

对正交试验结果进行多因素方差分析发现，膦胺霉素和洛伐他汀对秦艽马钱苷酸、龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷中含量的积累均无显著性影响。仅取样时间对马钱苷酸的含量积累有显著影响，对龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷的含量积累均无显著性影响（表 2）。

表 2 多因素方差分析表

Table 2 Multivariate analysis of variance

来源 Source	类别 Category	III 类平方和 Class III sum of squares	自由度 Free degree	均方 Mean square	*F*	显著性 Significance
修正模型 Modified model	马钱苷酸含量 Loganic acid content	10.155	9	1.128	3.211	0.085
	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	261.168	9	29.019	0.629	0.745
	獐芽菜苷含量 Sweroside content	22.731	9	2.526	1.139	0.453
	獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content	3.547	9	0.394	0.656	0.727
膦胺霉素浓度 Fosfomycin concentration	马钱苷酸含量 Loganic acid content	2.283	3	0.761	2.166	0.193
	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	54.653	3	18.218	0.395	0.762
	獐芽菜苷含量 Sweroside content	3.577	3	1.192	0.538	0.674

	獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content	0.847	3	0.282	0.470	0.714
洛伐他汀浓度 Lovastatin concentration	马钱苷酸含量 Loganic acid content	0.544	3	0.181	0.516	0.686
	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	39.829	3	13.276	0.288	0.833
	獐芽菜苷含量 Sweroside content	1.965	3	0.655	0.295	0.828
	獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content	0.281	3	0.094	0.156	0.922
取样天数 Sampling time	马钱苷酸含量 Loganic acid content	7.327	3	2.442	6.951	0.022*
	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	166.687	3	55.562	1.204	0.386
	獐芽菜苷含量 Sweroside content	17.189	3	5.730	2.584	0.149
	獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content	2.419	3	0.806	1.342	0.346
误差 Error	马钱苷酸含量 Loganic acid content	2.108	6	0.351		
	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	276.871	6	46.145		
	獐芽菜苷含量 Sweroside content	13.303	6	2.217		
	獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content	3.605	6	0.601		

注：*表示 $P<0.05$ 水平上显著差异。

Note: *Indicates significant differences at 0.05 level.

2.3 相关性分析

相关性分析发现，取样天数与獐牙菜苦苷含量呈显著负相关，与马钱苷酸、龙胆苦苷和

獐牙菜苷的含量呈极显著负相关。马钱苷酸与獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷的含量呈显著正相关。獐牙菜苦苷与龙胆苦苷、獐牙菜苷的含量呈极显著正相关。龙胆苦苷与獐牙菜苷含量呈极显著正相关（表 3）。相关性结果表明，当以 MEP 和 MVA 途径的抑制剂膦胺霉素和洛伐他汀处理秦艽幼苗，可显著影响马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷的含量，表明洛伐他汀与膦胺霉素可作为研究裂环环烯醚萜类化合物生源合成途径代谢调控机制的有效抑制剂。取样天数与代谢产物含量呈负相关，表明随着取样天数的延长，代谢产物含量的生成呈降低趋势。此外，4 种裂环环烯醚萜化合物之间含量变化呈正相关，推测 4 种裂环环烯醚萜类化合物在秦艽体内响应抑制剂的调控模式可能相似。

表 3 相关性分析结果

Table 3 Correlation analysis results

指标 Index	膦胺霉素浓度 Fosfomycin concentration	洛伐他汀浓度 Lovastatin concentration	取样天数 Sampling time	马钱苷酸含量 Loganic acid content	獐牙菜苦苷含量 Swertiamarin content	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside conten	獐牙菜苷含量 Sweroside content
膦胺霉素浓度 Fosfomycin concentration	1						
洛伐他汀浓度 Lovastatin concentration	0	1					
取样天数 Sampling time	0	0	1				
马钱苷酸含量 Loganic acid content	-0.319	-0.039	-0.728**	1			
獐牙菜苦苷含量 Swertiamarin content	0.099	-0.013	-0.526*	0.539*	1		
龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	-0.078	0.065	-0.651**	0.606*	0.931**	1	
獐牙菜苷含量 Sweroside content	0.020	-0.021	-0.668**	0.616*	0.933**	0.932**	1

注：*表示 $P<0.05$ 水平上显著差异；**表示在 $P<0.01$ 水平上显著差异。

Note: *Indicates significant differences at 0.05 level; **Indicates significant differences at 0.01 level.

2.4 极差分析

极差分析发现，影响 4 种裂环烯醚萜类化合物含量的因素由强到弱的顺序是取样天数＞膦胺霉素浓度＞洛伐他汀浓度。极差分析结果表明取样天数对次生代谢产物含量的影响因素最大，其次是膦胺霉素浓度，洛伐他汀浓度影响次之（表 4）。

表 4 极差分析结果

Table 4 Range analysis results

指标 Index	水平 Level	膦胺霉素浓度 Fosfomycin concentration	洛伐他汀浓度 Lovastatin concentration	取样天数 Sampling time
马钱苷酸含量 Loganic acid content	K1	2.302	1.925	2.757
	K2	1.5	1.412	1.717
	K3	1.578	1.723	1.17
	K4	1.305	1.625	1.04
	极差 Range	0.997	0.512	1.717
獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content	K1	1.788	2.202	2.325
	K2	1.933	1.835	2.447
	K3	2.398	1.97	1.778
	K4	1.933	2.043	1.5
	极差 Range	0.61	0.367	0.947
龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content	K1	16.59	18.05	20.75
	K2	17.36	16.36	22.13
	K3	21.39	17.72	15.49
	K4	15.05	18.26	12.01
	极差 Range	6.34	1.9	10.12
獐芽菜苷含量 Sweroside content	K1	3.535	4.457	5.172
	K2	4.09	3.49	4.878
	K3	4.755	4.148	3.305
	K4	3.683	3.968	2.708
	极差 Range	1.22	0.967	2.465
	排秩 Patch	2	3	1

注：K1、K2、K3、K4 分别表示因素的 1、2、3、4 水平。

Note: K1, K2, K3 and K4 represent the 1, 2, 3 and 4 levels of factors.

本实验考查抑制剂对秦艽 4 种裂环烯醚萜类化合物含量的影响，关注引起化合物含量降低的因素，因此根据极差分析结果（表 4），A（4）B（2）C（4）即膦胺霉素 400 μmol·L^{-1}，洛伐他汀 50 μmol·L^{-1}，处理 6 天为马钱苷酸的最佳抑制条件；A（1）B（2）C（4）即膦胺

霉素 0 μmol•L-1，洛伐他汀 50 μmol•L-1，处理 6 天为獐芽菜苦苷的最佳抑制条件，A（4）B（2）C（4）即膦胺霉素 400 μmol•L-1，洛伐他汀 50 μmol•L-1，处理 6 天为龙胆苦苷的最佳抑制条件，A（1）B（2）C（4）即膦胺霉素 0 μmol•L-1，洛伐他汀 50 μmol•L-1，处理 6 天为獐芽菜苷的最佳抑制条件。综合考虑，4 种代谢产物最佳的抑制条件为 A（4）B（2）C（4）即膦胺霉素 400 μmol•L-1，洛伐他汀 50 μmol•L-1，处理天数为 6 d（图 3）。

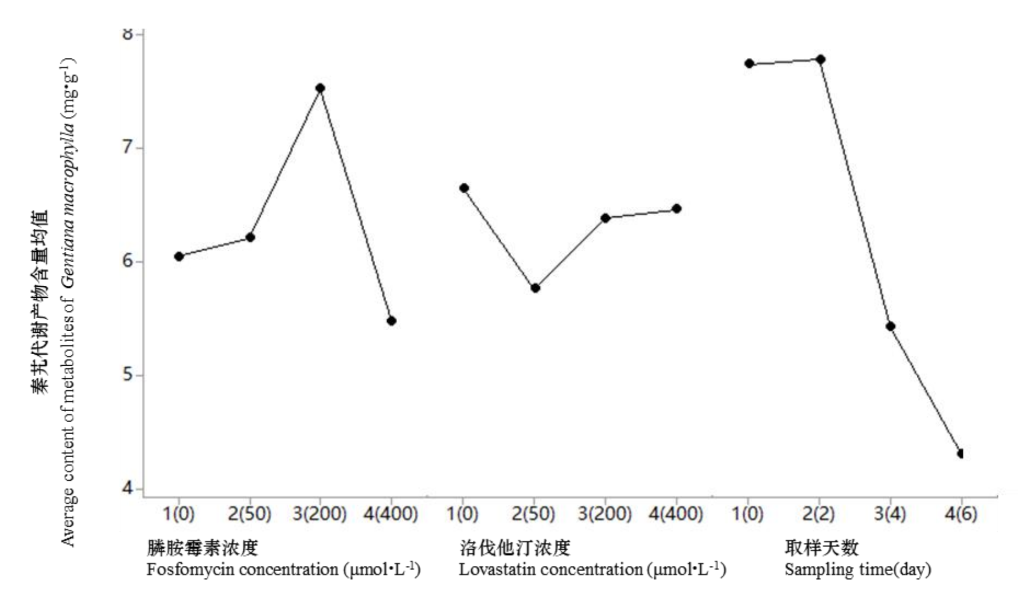


图 3 正交试验中各因素与秦艽裂环环烯醚萜含量的关系

Fig. 3 Relationship between factors in orthogonal test and content of iridoid in *Gentiana macrophylla*

2.5 验证实验

以正交实验设计筛选所得最优抑制条件处理秦艽一月生幼苗，重复 3 次，检测其次生代谢产物含量，以验证最优抑制条件的可靠性。验证实验结果表明，与空白组相比，处理组中 4 种裂环环烯醚萜的含量均有不同程度的降低，马钱苷酸、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷以及獐芽菜苷含量分别下降了 69%、36%、33%和 4%（表 5）。表明最优抑制条件为洛伐他汀 50 μmol•L-1、膦胺霉素 400 μmol•L-1 和取样天数 6 d。

表 5 验证实验结果

Table 5 Verification test results

实验分组 Experimental groups	马钱苷酸含量 Loganic acid content (mg•g-1)	獐芽菜苦苷含量 Swertiamarin content (mg•g-1)	龙胆苦苷含量 Gentiopicroside content (mg•g-1)	獐芽菜苷含量 Sweroside content (mg•g-1)
空白组 Blank group	5.926 3±0.038 6	1.905 1±0.013 0	28.878 3±1.505 8	4.605 8±0.066 8
处理组 Processing group	1.847 7±0.045 8	1.215 3±0.035 6	19.333 8±0.716 9	4.426 9±0.260 7

3 讨论与结论

秦艽作为中国传统药材，裂环环烯醚萜类化合物是其主要的药用有效成分。该类次生代谢产物的生源合成途径经 MVA 和 MEP 途径合成焦磷酸香叶酯（geranyl pyrophosphate，GPP），再经过裂环等多步酶促反应合成马钱苷酸，龙胆苦苷等萜类化合物（康恒等，2021）。本研究以膦胺霉素浓度、洛伐他汀浓度以及取样时间为 3 个主要因素进行了 3 因素 4 水平的正交实验，筛选了可显著抑制马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷的最佳条件。本研究中极差分析结果表明，膦胺霉素对代谢产物含量的抑制效果高于洛伐他汀，推测 MEP 途径在秦艽裂环烯醚萜类次生代谢产物的合成途径中起主导作用，与王彩云等（2014）基于对滇龙胆转录组数据推测龙胆苦苷生物合成主要来源于 MEP 途径，部分来源于 MVA 途径的推论相似。此外，抑制剂对马钱苷酸的含量降低程度显著强于獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷，推测马钱苷酸可能相较其余 3 种代谢产物位于代谢通路的上游，因此抑制剂对马钱苷酸含量的影响最大。相关性分析发现 4 种代谢产物含量的变化具有显著正相关关系，依据代谢途径推测马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷对抑制剂的响应具有“级联趋同”的调控模式。而取样天数和代谢产物含量呈显著负相关，即抑制剂处理时间越长，4 种裂环烯醚萜含量的呈显著降低趋势，但关于抑制剂对代谢产物影响的最长时效还需要进一步的研究。

基于本研究正交法优化的最佳抑制条件为膦胺霉素 400 $\mu mol \cdot L^{-1}$，洛伐他汀 50 $\mu mol \cdot L^{-1}$，取样天数为 6 d，在该条件下马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷的含量均有所下降，分别下降了 69%、36%、33%和 4%。表明基于正交法筛选的抑制条件可作为进一步研究秦艽中主要次生代谢产物 MVA 和 MEP 合成途径调控机制的最优抑制条件。本文所得最佳抑制条件，将为后期研究秦艽裂环烯醚萜类化合物生物合成过程 MVA 和 MEP 代谢通路的调控机制奠定一定的基础。

参考文献：

CAO XY, GUO XR, YANG XB, et al., 2016. Transcriptional responses and gentiopicroside biosynthesis in methyl jasmonate-treated *Gentiana macrophylla* seedlings[J]. PLoS ONE, 11(11): e0166493.

HUA WP, ZHENG P, HE YH, et al., 2014. An insight into the genes involved in secoiridoid biosynthesis in *Gentiana macrophylla* by RNA-seq[J]. Mol Biol Rep, 41(7): 4817-4825.

KANG H, ZHAO ZL, NI LH, et al., 2021. Transcriptome analysis and validation of key genes involved in biosynthesis of iridoids in *Gentiana lhassica*[J]. Chin J Trad Chin Med, 46(18): 4704-4711. [康恒，赵志礼，倪梁红，等，2021. 全萼秦艽转录组中环烯醚萜类相关基因挖掘及验证[J]. 中国中药杂志，46(18)：4704-4711.]

LI GW, WANG L, 2018. Anti-inflammatory and analgesic effects of QinJiao in the treatment for arthritis[J]. W Trad Chin Med, 31(3): 133-136. [李跟旺，王磊，2018. 秦艽在关节炎抗炎镇痛治疗中的作用[J]. 西部中医药，31(3)：133-136.]

LIAO P, HEMMERLIN A, BACH T J, et al., 2016. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production[J]. Biotechnol Adv, 34(5): 697-713.

LI T, YU X, REN YM, et al., 2022. The chromosome-level genome assembly of *Gentiana*

dahurica (*Gentianaceae*) provides insights into gentiopicroside biosynthesis[J]. DNA Res, 29(2): 1-10.

LIU L, 2012. Research on MVA and MEP ginsenoside biosynthesis pathway by utilizing inhibitors[D]. Jilin: Jilin University. [刘丽，2012. 利用抑制剂对人参皂苷生物合成途径 MVA 与 MEP 的研究[D]. 吉林：吉林大学.]

LUO YY, DU WF, YING ZX, et al., 2019. Optimization of extraction process of coix seed polysaccharide by response surface methodology combined with orthogonal experimental design[J]. Chin J Trad Chin Med, 34(10): 4847-4851. [罗云云，杜伟锋，应泽茜，等，2019. 响应面法协同正交试验设计优化薏苡仁多糖提取工艺研究[J]. 中华中医药杂志，34(10)：4847-4851.]

MIETTINEN K, DONG L, NAVROT N, et al., 2014. The seco-iridoid pathway from *Catharanthus roseus*[J]. Nat Comm, 5: 3606.

MUHAMAD FADZIL NS, MAHENDRAN S, SIEW HG, et al., 2021. Chemistry, pharmacology and therapeutic potential of Swertiamarin-A promising natural lead for new drug discovery and development[J]. Drug Des Devel Ther, 15: 2721-2746.

National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the people's republic of China[S]. One. Beijing: The Med Sci and Tech Press of China, 2020: 282. [国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社，2020：282.]

RATHER GA, SHARMAA, JEELANI SM, et al., 2019. Metabolic and transcriptional analyses in response to potent inhibitors establish MEP pathway as major route for camptothecin biosynthesis in *Nothapodytes nimmoniana* (Graham) Mabb[J]. BMC Plant Biol, 19(1): 301.

PENG MC, AI XH, 2021. Research progress in chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of the flowers of *Gentianae macrophylla*[J] Centr S Pharm, 19(6): 1243-1249. [彭美晨，艾晓辉，2021. 秦艽花化学成分、药理作用及其临床应用的研究进展[J]. 中南药学，19(6)：1243-1249.]

SINHA RK, SHARMA SN, VERMA SS, et al., 2018. Effects of lovastin, fosmidomycin and methyl jasmonate on andrographolide biosynthesis in the *Andrographis paniculata*[J]. Acta Physiol Plant, 40(9): 1-11.

TUNDIS R, LOIZZO MR, MENICHINI F, et al., 2008. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments[J]. Mini rev Med Chem, 8(4): 399-420.

WANG CY, ZHANG XD, SHEN T, et al., 2014. Research progress of biosynthesis pathway of gentiopicroside [J]. Jiangsu Agric Sci, 42(3): 4-9. [王彩云，张晓东，沈涛，等，2014. 龙胆苦苷生物合成途径研究进展[J]. 江苏农业科学，42(3)：4-9.]

WEI JS, 2013. Research on biosynthesis manipulation of isoprenoids based on HMGR and DXR genes from *Amomum villosum* Lour[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine. [魏洁书，2013. 基于阳春砂 HMGR 和 DXR 基因的萜类化合物生物合成调控研究[D]. 广州：广州中医药大学.]

WU XY, LIU XL, 2017. Progress of biosynthetic pathway and the key enzyme genes of iridoids[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 26(8): 44-48. [吴昕怡，刘小莉，2017. 环烯醚萜类成分生物合成途径及关键酶基因研究进展[J]. 中国民族民间医药，26(8)：44-48.]

YANG DF, DU XH, LIANG X, et al., 2012. Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia*

miltiorrhiza hairy roots[J]. PLoS ONE, 7(11): e46797.

YANG FX, WANG Y, XIA PF, et al., 2020. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Gentianae macrophyllae* Radix and quality markes(Q-marker) prediction and analysis [J]. Chin Trad Herb Drug, 51(10): 2718-2731. [杨飞霞，王玉，夏鹏飞，等，2020. 秦艽化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药，51(10)：2718-2731.]

YANG YF, HOU S, FAN W, et al., 2019. Expression patterns of some genes involved in tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* roots[J]. Ind Crops Products, 130: 606-614.

YU SC, DENG HY, JIANG Y, et al., 2013. A research on optimum conditions for algal inhibition by reed extract[J]. Acta Hydrobiol Sin, 37(6): 1051-1058. [于淑池，邓红英，姜燕，等，2013. 芦苇秆浸出液抑藻的最佳环境条件研究[J]. 水生生物学报，37(6)：1051-1058.]